

# Evaluation of Agronomic Traits and Environmental Risk of a Transgenic Rice Line, CT2, with an Oat Thionin Gene in an Isolated Paddy Field.

Osamu Yatou<sup>\*1</sup>, Fumiyooshi Fukumoto<sup>\*1\*2</sup>, Hiroya Higuchi<sup>\*1</sup>,  
Masahiro Oshima<sup>\*1</sup>, Tsuyoshi Yamamoto<sup>\*1</sup>, Toshihiko Nakajima<sup>\*1</sup>,  
Koichi Mori<sup>\*1</sup>, Takayoshi Iwai<sup>\*3\*4</sup> and Yuko Ohashi<sup>\*3</sup>

## Summary

A transgenic rice line, CT2, was evaluated for its agronomic traits and environmental risk in the isolated paddy field of Hokuriku Research Center, National Agricultural Research Center. CT2 was a transgenic rice line with an oat thionin gene which encodes an anti-bacterial protein, thionin. The cloned thionin gene was connected with a constitutive high-expression modified CaMV 35S promoter and introduced to a rice cultivar "Chiyohonami" by Iwai T. *et al*<sup>(7)</sup>. The transformants had been evaluated for their resistance to bacterial disease in an isolated green house, and were shown to contain improved resistance against *Burkholderia glumae* and *Burkholderia plantarii*. A transgenic line, CT2, was selected among the resistant transformants based on its normal growth in the isolated green house for the field performance test of this report.

In this evaluation in the isolated paddy field, CT2 showed the obvious resistance against *B. glumae* and *B. plantarii*, as the previous evaluation in the isolated green house. However, the resistance against another bacteria, *Acidovorax avenae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, was the same degree as in the original cultivar.

In the risk evaluation, there were not any difference between CT2 and the original cultivar in traits, whose alteration could affect the possibility of escape to natural environment and the effect to surrounding ecosystem. Therefore the environmental effect resulted from the cultivation of CT2 would be the same as of the original cultivar.

In some agronomic traits, CT2 showed several slight differences to the original cultivar. The heading date was 2 days earlier than the original cultivar, the plant height was slightly lower, grains had slightly longer shape, grain weight was slightly larger, seed fertility was slightly lower, and grain yield was 10 % lower. Based on the analysis of the observation of these traits, some of these differences were considered to be the results of mutations which were induced during the transformation procedure and the other differences might be caused by the intensive expression of the introduced gene. However, these difference found here might not lead to the difference in the environmental effect of CT2 and the original cultivar, because the differences were small and in every traits CT2 had lesser biological activity. Therefore, even with these slight differences, the environmental effect of CT2 would

---

Received : 20 December, 2002

\*<sup>1</sup>Hokuriku Research Center, National Agricultural Research Center

\*<sup>2</sup>National Agricultural Research Center for Hokkaido Region

\*<sup>3</sup>National Institute of Agrobiological Sciences

\*<sup>4</sup>Miyagi Prefectural Agriculture and Horticulture Research Center

not be different to the original cultivar.

To remove the disadvantage of constitutive high-expression of an alien protein, thionin, in rice cell, use of a promoter which confers coleoptile specific high-expression would be ideal, resulting a high level of resistance in the coleoptile whichh is the target organ of the bacteria.

であるかどうかは今回の検定の範囲では確認できないが、少なくとも抵抗性の向上は認められないと考えられる。

Iwai, T. *et al.*<sup>(7)</sup>は、イネ苗立枯細菌が種子伝染によって苗が感染するとまずイネの子葉鞘の細胞壁に接するが、CT2では細胞壁に塩基性タンパク質であるチオニン蛋白質が吸着しているためCT2の幼苗が抵抗性を発揮すると推定した。

田部井<sup>(8)</sup>はイネ白葉枯病は、種子伝染はせず、本田の灌漑水系によって水媒伝染し、葉の排水組織の水孔からイネの体内に侵入し導管を經由して体内に広まることを報告した。CT2がイネ白葉枯病に対して抵抗性をもたなかったことの原因としては、チオニン遺伝子の抗菌性特性の差異の可能性の他に、菌のこのような感染機構が要因である可能性も推定される。

一方、イネ褐条病菌の感染経路はイネもみ枯細菌病およびイネ立枯細菌病と同じと考えられるため、CT2で抵抗性が認められなかったことは菌の感染や病原性の特性と抗菌タンパク質であるチオニンとの相互関係の結果と考えられるが、詳細な原因は不明である。

#### 4. 遺伝子変異および生理障害の除去

供試したCT2では低い頻度で不稔で矮性の個体が分離した。前述のとおり、これは導入遺伝子とは関係のない培養突然変異であると推定されるため、今

後の系統選抜で容易に除去できると考えられる。出穂日、穂揃い等の変異については、培養突然変異の可能性が推察されるものの、戻し交配等の方法によって導入遺伝子との関連を調査する必要がある。これらの目的で、現在、戻し交配と後代検定を進めている。

CT2が抵抗性を示したイネ苗立枯細菌病およびイネもみ枯細菌病は種子伝染性であり、保温した育苗床では汚染種子からの2次感染で被害が助長されることを門田<sup>(9)</sup>、畔上<sup>(1)</sup>、内藤<sup>(15)</sup>および後藤<sup>(6)</sup>が確認している。このため、これらの防除の目的ではエンバク・チオニン遺伝子を発芽時の子葉鞘でのみ特異的に高発現するプロモーターの支配下このエンバク・チオニン遺伝子を接続し、幼苗期のみ抵抗性を発現させるような導入ベクターの設計が効果的だと考えられる。本試験でみられたCT2の登熟期後半の葉の褐変、収量低下は導入遺伝子の本田での高発現の影響である可能性が高いため、生育段階特異的に発現させることで、このような障害をさけることができると期待できる。これらの病原菌は、苗箱で感染した苗の移植ともなって水田に運ばれた菌が、水田で他の様に感染し増殖し、開花期にもみに侵入することによって種子伝染する。このため、幼苗期に十分な抵抗性を与えることで水田での感染も十分に抑制できると考えられる。このような目的で、エンバク・チオニン遺伝子を新たな形質転換ベクターに組み込み、組換え体の育成を行っている。

## 摘 要

エンバク・チオニン遺伝子を導入した組換えイネ系統 (CT2) について、隔離圃場で特性調査および環境に対する安全性評価試験を行った。チオニンは細菌に対する抗菌活性をもつタンパク質で、組換え系統CT2は水稻品種「チヨホナミ」に恒常的高発現プロモーターの支配下にエンバク由来のチオニン遺伝子を高発現するようにした系統である。これまでの温室内試験と同様にCT2は隔離圃場でイネ苗立枯細菌病に対する抵抗性が顕著であり、イネもみ枯細菌病にも効果が認められたが、イネ褐条病とイネ白葉枯病には効果はなかった。農林水産省が定めた指針に基づく環境に対する安全性評価項目のうち、有毒物質産生性、雑草性および環境 (生態系) への影

響に関する試験項目では、CT2は「チヨホナミ」と差異は認められなかった。したがってCT2の栽培が環境に与える影響は原品種を栽培した場合と同様と考えられる。一方、CT2は「チヨホナミ」に比べて出穂期が2日早く、稈長がやや短く、玄米がやや長粒、千粒重はやや重く、種子稔性がやや低く、玄米収量がやや低下する等、形態特性、生育特性および生殖・稔性特性の一部にわずかな差異が認められた。各特性の調査からこれらの差異の一部は形質転換操作に伴う突然変異と考えられ、また導入遺伝子の効果と考えられた。これらの差異は環境へ影響を及ぼすものではないので、安全性評価結果には影響はないと考えられる。